

D E 694 09 830 (EP 0 733 206 B1)

Abstract not available for D E 69409830

Abstract of corresponding document: **W09516202**

A nucleic acid analogue of the PNA type is provided with a kemptide motif and radio-labelled by phosphorylation at a service residue in said motif to provide a radio-labelled nucleic acid analogue having a specific activity in excess of 1×10^5 cpm/ μ g 32 P.



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Übersetzung der
europäischen Patentschrift

⑧7 EP 06 B 1
⑩ D 4 09 830 T 2

⑤1 Int. Cl.⁶:
G 01 N 33/533
C 07 K 14/00
C 12 Q 1/68
C 07 H 21/00

DE 694 09 830 T 2

②1	Deutsches Aktenzeichen:	694 09 830.2
⑧8	PCT-Aktenzeichen:	PCT/EP94/03972
⑧6	Europäisches Aktenzeichen:	95 903 781.3
⑧7	PCT-Veröffentlichungs-Nr.:	WO 95/16202
⑧8	PCT-Akten-Idetag:	30. 11. 94
⑧7	Veröffentlichungstag der PCT-Meldung:	15. 6. 95
⑧7	Erstveröffentlichung durch das EPA:	25. 9. 96
⑧7	Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA:	22. 4. 98
④7	Veröffentlichungstag im Patentblatt:	24. 9. 98

③0 Unionspriorität:
9324956 06. 12. 93 GB

⑦3 Patentinhaber:
PNA Diagnostics A/S, Kopenhagen, Nielsen,
Peter Eigil, Kokkedal, DK

⑦4 Vertreter:
derzeit kein Vertreter bestellt

⑧4 Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, IE, IT LU, NL, SE

⑦2 Erfinder:
ORUM, Henrik, 3500 Vaerlose, DK; NIELSEN, Peter
Eigil, Prof. Dr., 2980 Kokkedal, DK; STANLEY,
Christopher John, Huntingdon, Cambridgeshire
PE17 4JB, GB

⑤4 MARKIEREN VON NUKLEINSÄURE-SEQUENZEN PEPTID-CHIMÄREN

DE 694 09 830 T 2

Anmerkung: Innerhalb von 3 Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patentamt inhaltlich nicht geprüft.

3 Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patentamt inhaltlich nicht geprüft.

09.05.90

EP-Anmeldung Nr.: 95 903 781.3

Die vorliegende Erfindung betrifft die Herstellung markierter Nucleinsäure-Analoga und deren Verwendung bei analytischen Verfahren.

Nucleinsäure-Analoga mit wichtigen neuen Nutzbereichen in Analyseverfahren und auf dem Gebiet der Diagnostik sind in WO 92/20703 beschrieben. Diese Nucleinsäure-Analoga besitzen eine Reihe neuartiger Eigenschaften, die ihnen besondere Bedeutung auf dem Gebiet der Diagnostik sowie auf dem Gebiet der Antisense-Therapeutik verleiht.

Sie zeichnen sich typischerweise durch ein Polyamid-Gerüst aus, das eine Sequenz aus Liganden trägt, die Nucleinsäure-Basen sind. Die dort beschriebenen Analoga besitzen die Eigenschaft, mit hoher Spezifität und Stabilität an natürliche Nucleinsäuren komplementärer Sequenz zu hybridisieren.

Um Nachweis und Handhabung derartiger Nucleinsäure-Analoga bei diagnostischen oder anderen analytischen Verfahren und dergleichen Arbeitsgängen zu erleichtern, ist es wünschenswert, die Nucleinsäure-Analoga mit nachweisbaren Markierungen zu versehen.

In US-A-4 923 802 ist ein Assay auf Proteinkinase C beschrieben, bei dem radiomarkiertes ATP und ein hochspezifisches Peptidsubstrat eingesetzt werden, welches in der Grundform aus einem Serin- oder Threonin-Aminosäurerest zusammengesetzt ist, flankiert von Gruppen basischer Aminosäuren, die gänzlich aus Arginin, Lysin oder Histidin oder irgendeiner Kombination dieser Aminosäurereste zusammengesetzt sind. Bei diesem Assay wird die Phosphat-Gruppe des ATP durch die Proteinkinase C auf das Peptid übertragen. Das Vorhandensein der Markierung am Peptid dient als Maß für die Bestimmung der Enzym-Aktivität der Proteinkinase C.

09.05.98

- 2 -

Es wurde vorgeschlagen, derartige Nucleinsäure-Analoga radioaktiv zu markieren. Auch andere Markierungstechniken wurden vorgeschlagen. Wir haben nun bestimmte chimäre Strukturen entwickelt, bei denen ein wie bereits beschriebenes Nucleinsäure-Analogon an eine Peptid-Struktur geknüpft wird (d.h., eine Folge Peptid-gebundener Aminosäuren), welches so ausgewählt ist, daß die Chimäre eine zweckmäßige Markierungsreaktion eingeht.

Demgemäß macht die vorliegende Erfindung in einem ersten Aspekt ein Verfahren zum Markieren eines Nucleinsäure-Analogons verfügbar, umfassend das Bereitstellen eines Nucleinsäure-Analogons mit einer Peptid-Struktur, die als Substrat für ein Enzym in einer Markierungsreaktion fungieren kann, und das Durchführen einer solchen Markierungsreaktion, umfassend das Umsetzen der Peptid-Struktur des Nucleinsäure-Analogons mit einem Ausgangsstoff für die Markierung unter dem Einfluß eines Enzyms. Vorzugsweise ist die Markierung eine Radiomarkierung, vorzugsweise radiomarkiertes ATP.

Das radioaktive Atom in der Radiomarkierung ist vorzugsweise ^{32}P in der γ -Position.

Alternativ kann die Markierung jedoch auch irgendeine andere nachweisbare Markierung sein, die sich in einer enzymvermittelten Reaktion an ein Peptid knüpfen läßt, z.B. eine Biotin-Markierung.

Das Enzym ist vorzugsweise eine Proteinkinase.

Die Peptid-Struktur ist vorzugsweise die Kemptid-Struktur, d.h., H-Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly-. Es ist bekannt, daß diese Struktur bei Vorhandensein in einem Protein oder Peptid eine Markierungsreaktion eingeht, bei der sie als Substrat für die Einwirkung von Proteinkinase A fungiert, und am Serin-Rest phosphoryliert ist. Es können auch andere

09.05.90

- 3 -

phosphorylierbare Strukturen verwendet werden. Zu diesen gehören gekürzte Kemptid-Strukturen, z.B. die ersten fünf Aminosäurereste der Kemptid-Struktur, H-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly-.

Vorzugsweise ist daher die Markierungsreaktion eine Phosphorylierung an einem Serin-Rest der Peptid-Struktur.

Das Nucleinsäure-Analogon ist vorzugsweise eines, das einen polymeren Strang umfaßt, der eine Sequenz aus Liganden enthält, die an ein Gerüst gebunden sind, das aus verknüpften Gerüsteinheiten besteht, wobei das Analogon imstande ist, an eine Nucleinsäure komplementärer Sequenz zu hybridisieren und des weiteren diese Peptid-Struktur umfaßt.

Das Nucleinsäure-Analogon-Gerüst ist vorzugsweise ein Polyamid-, Polythioamid-, Polysulfinamid- oder Polysulfonamid-Gerüst.

Vorzugsweise sind die verknüpften Gerüsteinheiten Peptidgebundene Aminosäure-Einheiten, und vorzugsweise liegt die Peptid-Struktur am N-terminalen Ende oder am C-terminalen Ende vor.

Vorzugsweise kann das Nucleinsäure-Analogon an eine Nucleinsäure komplementärer Sequenz hybridisieren, um ein Hybrid zu bilden, das stabiler gegen Denaturierung durch Wärme ist als ein Hybrid zwischen dem herkömmlichen, in der Sequenz dem Analogon entsprechenden Deoxyribonucleotid und der Nucleinsäure.

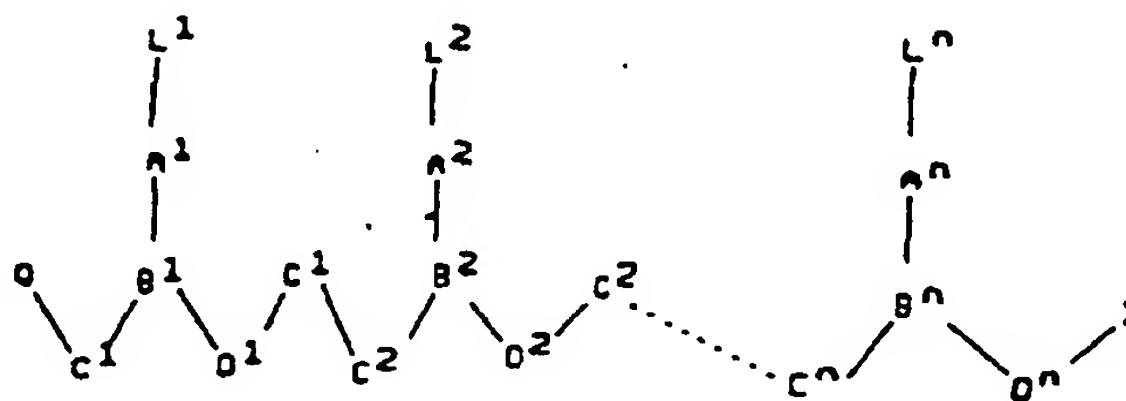
Vorzugsweise ist das Nucleinsäure-Analogon eine Peptidnucleinsäure, bei der das Gerüst ein Polyamid-Gerüst ist, wobei jeder Ligand direkt oder indirekt an ein Aza-Stickstoff-Atom im Gerüst gebunden ist, und die Liganden tragenden Stickstoff-Atome vorwiegend durch 4 bis 8 dazwischliegende Atome voneinander im Gerüst getrennt sind.

09.05.90

- 4 -

Vorzugsweise kann zudem das Nucleinsäure-Analogon an eine doppelsträngige Nucleinsäure hybridisieren, in der ein Strang eine zu dem Analogon komplementäre Sequenz aufweist, um so den anderen Strang von diesem einen Strang zu verdrängen.

Vorzugsweise hat das Nucleinsäure-Analogon die allgemeine Formel I:



Formel I

worin:

n wenigstens 2 ist;

jedes der L^1-L^n unabhängig ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, Hydroxy, (C_1-C_4) -Alkanoyl, natürlich vorkommenden Nucleobasen, nicht natürlich vorkommenden Nucleobasen, aromatischen Einheiten, DNA-intercalierenden Agenzien, Nucleobase-bindenden Gruppen, heterocyclischen Einheiten und Reporter-Liganden, doch ist normalerweise wenigstens ein L eine Nucleobase-bindende Gruppe, etwa eine natürlich vorkommende Nucleobase, und vorzugsweise sind wenigstens 90% der L-Gruppen derartige Nucleobase-bindenden Gruppen;

jedes der C^1-C^n $(CR^6R^7)_y$ ist, wobei R^6 Wasserstoff ist und R^7 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus den Seitenketten natürlich vorkommender α -Aminosäuren, oder R^6 und R^7 unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, (C_2-C_6) -Alkyl, Aryl, Aralkyl, Heteroaryl, Hydroxy, (C_1-C_6) -Alkoxy, (C_1-C_6) -Alkylthio, NR^3R^4 und SR^5 , wo-

09.05.98

- 5 -

bei R^3 und R^4 wie nachstehend definiert sind, und R^5 Wasserstoff, (C_1-C_6) -Alkyl ist, oder R^6 und R^7 zusammenge-
nommen ein alicyclisches oder heterocyclisches System ver-
vollständigen;

jedes der D^1-D^n $(CR^6R^7)_z$ ist, wobei R^6 und R^7 wie vorste-
hend definiert sind;

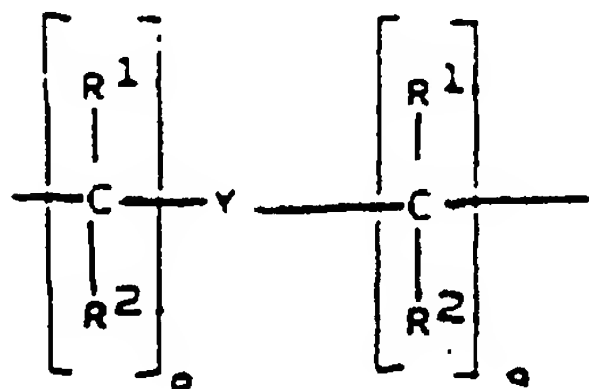
y und z jeweils null oder eine ganze Zahl von 1 bis 10
sind, wobei die Summe $y + z$ 2 bis 10 ist (vorzugsweise grö-
ßer als 2, und vorzugsweise so, daß x und y jeweils 1 oder
2 sind);

G^1-G^{n-1} jeweils $-NR^3CO-$, $-NR^3CS-$, $-NR^3SO-$ oder $-NR^3SO_2-$ in
beiden Orientierungen sind, wobei R^3 wie nachstehend defi-
niert ist;

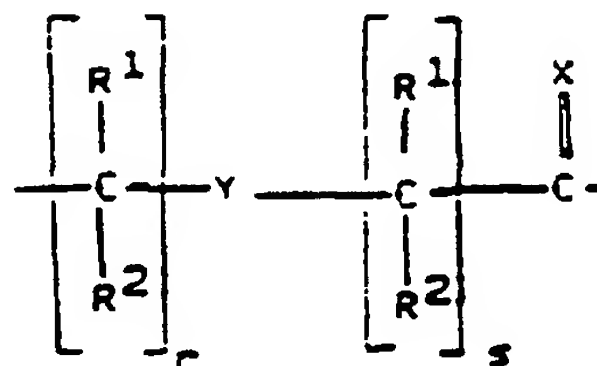
jedes der A^1-A^n und B^1-B^n so ausgewählt sind, daß:

(a) A eine Gruppe der Formel (IIa), (IIb), (IIc) oder (IIId)
ist, und B N oder R^3N^+ ist; oder

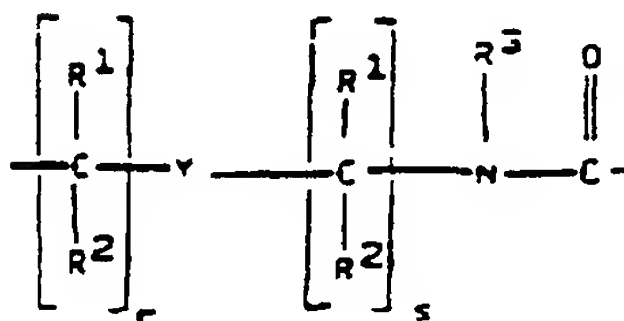
(b) A eine Gruppe der Formel (IIId) ist, und B CH ist;



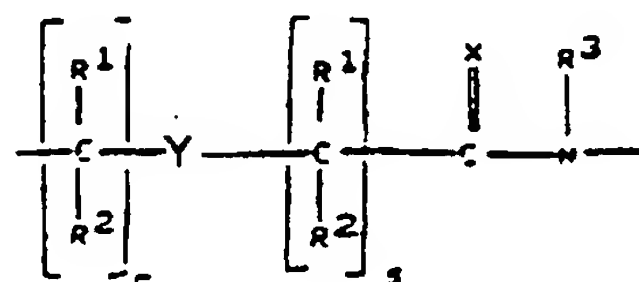
Formel IIa



Formel IIb



Formel IIc



Formel IIId

worin:

X O, S, Se, NR^3 , CH_2 oder $C(CH_3)_2$ ist;

Y eine Einfachbindung, O, S oder NR^4 ist;

p und q jeweils null oder ganze Zahlen von 1 bis 5 sind, wobei die Summe $p+q$ nicht größer als 10 ist;

r und s jeweils null oder ganze Zahlen von 1 bis 5 sind, wobei die Summe $r+s$ nicht größer als 10 ist;

R^1 und R^2 jeweils unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, (C_1-C_4) -Alkyl, das hydroxy- oder alkoxy- oder alkylthiosubstituiert sein kann, Hydroxy, Alkoxy, Alkylthio, Amino und Halogen; und

R^3 und R^4 jeweils unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, (C_1-C_4) -Alkyl, hydroxy- oder alkoxy- oder alkylthiosubstituiertem (C_1-C_4) -Alkyl, Hydroxy, Alkoxy, Alkylthio und Amino;

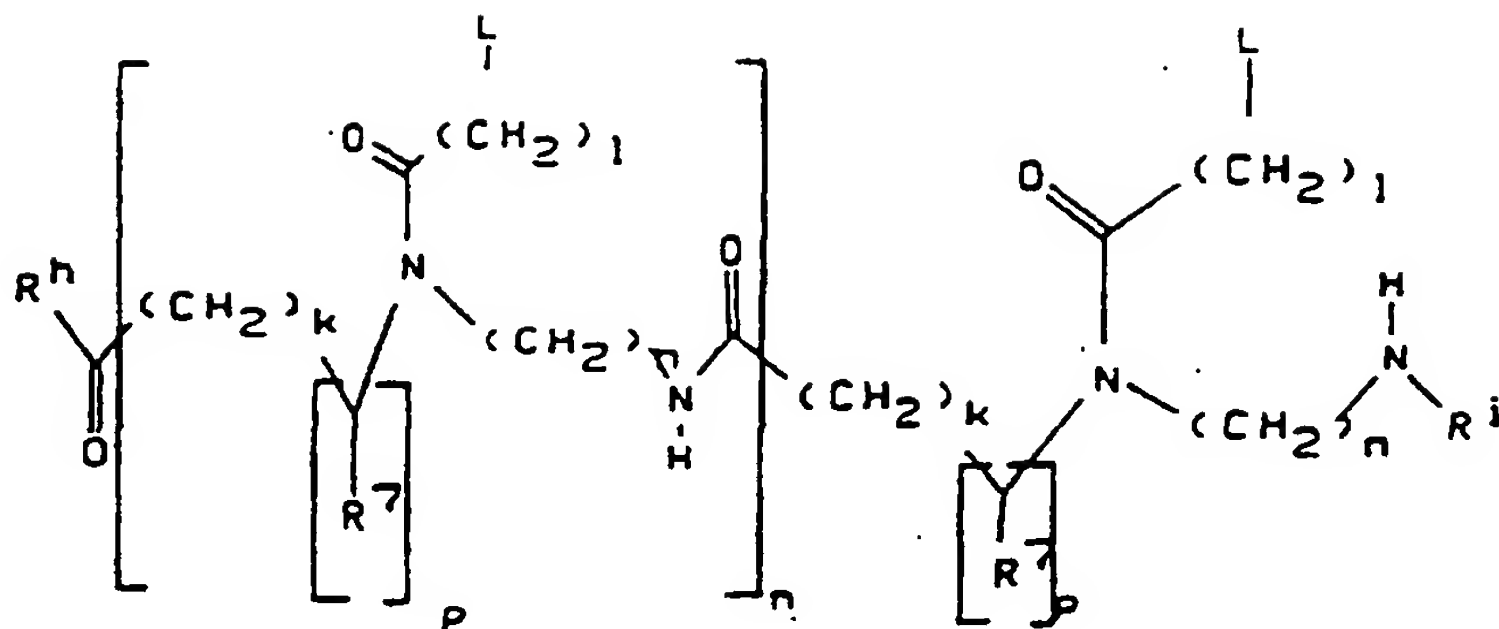
Q $-CO_2H$, $-CONR'R''$, $-SO_3H$ oder $-SO_2NR'R''$ oder ein aktivierte Derivat von $-CO_2H$ oder $-SO_3H$ ist; und

I $-NR'R'''$ ist, wobei R' und R'' unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, Alkyl, Schutzgruppen für Amino, Reporter-Liganden, intercalierenden Agenzien, Chelatbildnern, Peptiden, Proteinen, Kohlenhydraten, Lipiden, Steroiden, Nucleosiden, Nucleotiden, Nucleotiddiphosphaten, Nucleotidtriphosphaten, Oligonucleotiden, darunter sowohl Oligoribonucleotide als auch Oligodeoxyribonucleotide, Oligonucleosiden sowie löslichen und nichtlöslichen Polymeren und $-R'''$ eine R''' -Gruppe oder die Peptid-Struktur ist, wobei wenigstens eine L-Gruppe oder $-R'''$ die Peptid-Struktur ist.

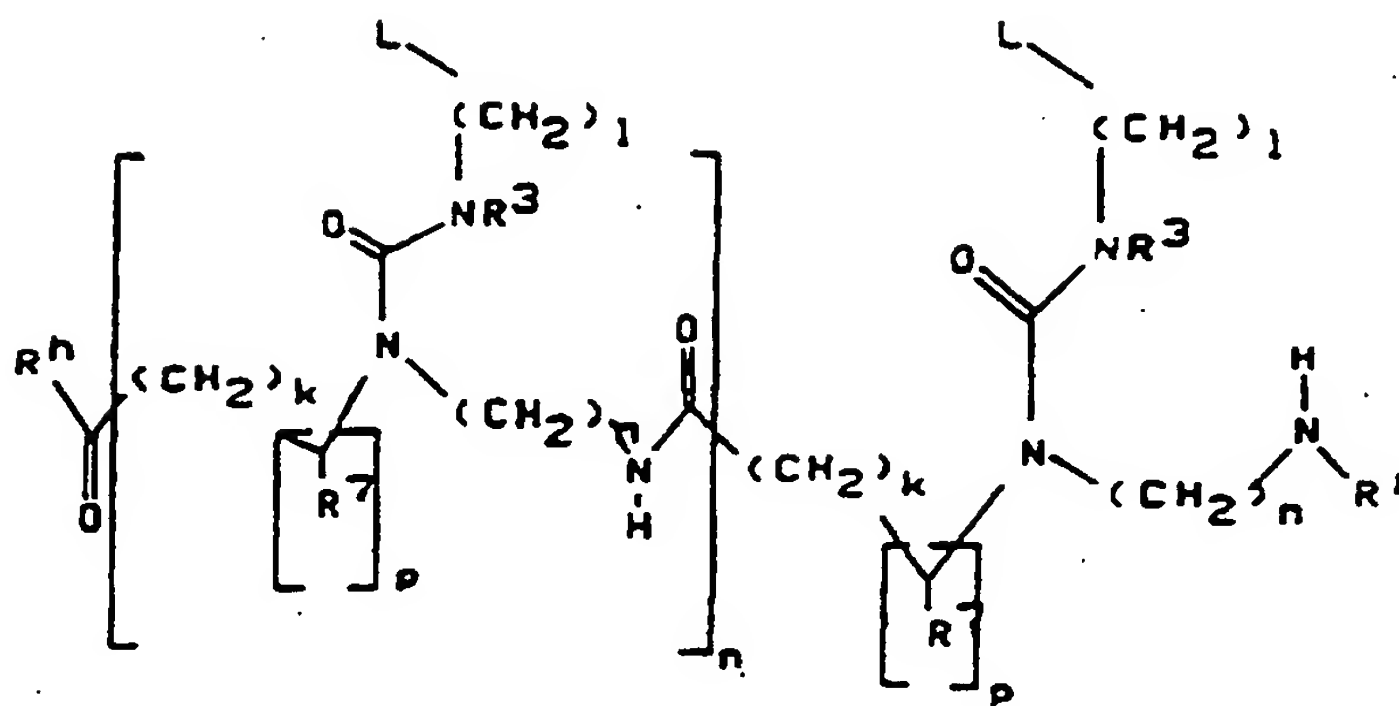
Mehrbevorzugt umfaßt das Nucleinsäure-Analogon eine Verbindung der allgemeinen Formel III, IV oder V:

09.05.98

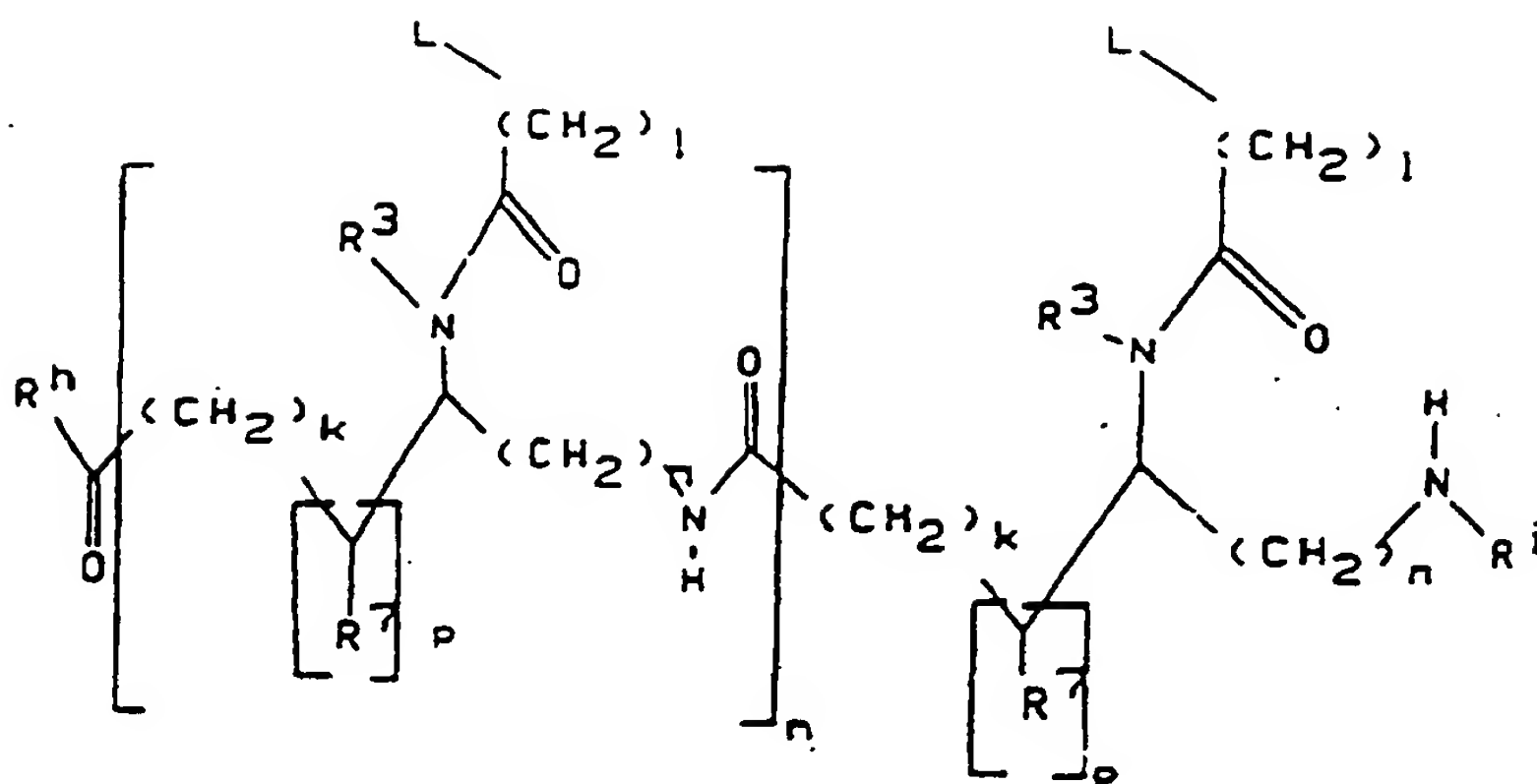
- 7 -



Formel III



Formel IV



Formel V

worin:

L jeweils unabhängig ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, Phenyl, heterocyclischen Einheiten, natürlich vorkommenden Nucleobasen und nicht natürlich vorkommenden Nucleobasen;

R⁷ jeweils unabhängig ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff und den Seitenketten natürlich vorkommender α -Aminosäuren;

n ein ganze Zahl größer 1 ist;

k, l und m jeweils unabhängig null oder ein ganze Zahl von 1 bis 5 sind;

p jeweils null oder 1 ist;

R^h OH, NH₂ oder -NHLysNH₂ ist; und

Rⁱ die Peptid-Struktur ist.

Vorzugsweise ist die Markierung eine ³²P-Markierung.

Vorzugsweise ist die enthaltene Markierung eine Phosphat-Gruppe, die an einen Serin-Rest geknüpft ist, der vorzugsweise einen Teil einer Peptid-Struktur bildet.

Die Peptid-Struktur enthält vorzugsweise die Kemptid-Struktur.

In einem dritten Aspekt stellt die Erfindung ein Nucleinsäure-Analogon bereit, umfassend einen polymeren Strang, der eine Sequenz aus Liganden enthält, die an ein Gerüst gebunden sind, das aus verknüpften Gerüsteinheiten besteht, wobei das Analogon imstande ist, an eine Nucleinsäure komplementärer Sequenz zu hybridisieren, und des weiteren umfassend eine Peptid-Struktur, die als Substrat für ein Enzym in einer Markierungsreaktion fungieren kann.

Vorzugsweise läßt sich die Peptid-Struktur mit radiomarkiertem ATP umsetzen, um die Peptid-Struktur in Gegenwart einer Proteinkinase zu phosphorylieren, und vorzugsweise ist die Peptid-Struktur deshalb die Kemptid-Struktur.

Vorzugsweise ist das Nucleinsäure-Analogon wie vorstehend im Zusammenhang mit dem ersten Aspekt der Erfindung beschrieben.

In einem vierten Aspekt macht die Erfindung ein analytisches Verfahren verfügbar, umfassend das Hybridisieren eines radiomarkierten Nucleinsäure-Analogons, hergestellt nach einem wie hinsichtlich des ersten Aspekts der Erfindung beschriebenen Verfahren, oder in Einklang mit dem zweiten Aspekt der Erfindung, an eine Nucleinsäure und Nachweisen der Gegenwart des so gebildeten Hybrids anhand der Radiomarkierung.

Vorzugsweise ist die nachzuweisende Nucleinsäure an einen Träger gebunden und wird mit dem markierten Nucleinsäure-Analogon geprüft.

Die Erfindung wird anhand der folgenden Beschreibung der bevorzugten Merkmale der Erfindung und anhand der Beispiele unter Bezugnahme auf die begleitenden Zeichnungen näher beschrieben und erläutert, worin:

09.05.99

- 10 -

Figur 1 ein Autoradiogramm ist, das in nachstehendem Beispiel 3 erzeugt wurde;

Figur 2 ein Autoradiogramm ist, das in nachstehendem Beispiel 4 erzeugt wurde.

PNAs mit Peptid-Erweiterungen gewünschter Aminosäure-Sequenz lassen sich mit Hilfe der in der Fachwelt gut verstandenen Boc- oder Fmoc-Festphasentechniken bequem herstellen sobald eine Ausgangs-PNA-Sequenz auf einem geeigneterweise festen Träger aufgebaut worden ist, wobei die in WO 92/20703 beschriebene Boc-Festphasensynthese angewandt wird. Alternativ kann die Peptid-Erweiterung zuerst synthetisiert werden, ehe die PNA-Sequenz in Angriff genommen wird.

Für die Radiomarkierung kann die Aminosäure Sequenz der Peptid-Struktur die Kemptid-Struktur sein. Für die Biotin-Markierung kann es eine wie in Biotechnology, Bd. 11, Okt. 1993, S. 1138-1142 von P.J. Schatz beschriebene Sequenz sein. Geeigneterweise ist die Sequenz:

Leu-x-Leu-Zle-Phe-Glu-Ala-Gln-Lys-Zle-Glu-Trp-Arg,
die durch die *E. coli*-Biotin-Holoenzym-synthetase am Lysin-Rest mit Biotin biotinyliert wird, welches als Biotinyl-5'-adenylat oder Biotin ad ATP zugeführt wird.

Das Biotin kann als Markierung verwendet werden, die durch Avidin oder Streptavidin nachgewiesen werden kann, oder es kann selbst eine Radiomarkierung wie etwa ^3H tragen.

Figur 3 zeigt eine Struktur von PNA(Peptidnucleinsäure)-Molekülen im Vergleich zu normaler DNA.

Figur 4 zeigt die Sequenz und die Nucleinsäure-Hybridisierungseigenschaften einiger hierin verwendeter PNAs.

09.05.98

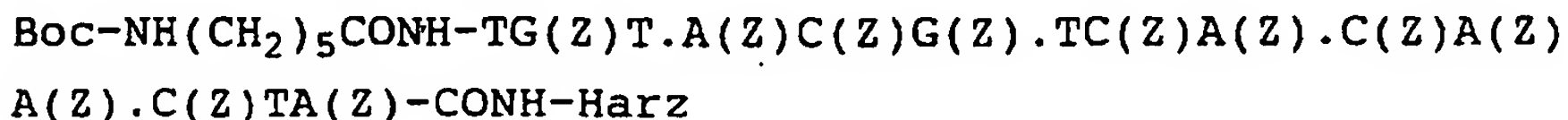
- 11 -

Figur 5 zeigt eine HPLC-Analyse einer Zeitstudie der enzymatischen Markierung der erfindungsgemäßen Moleküle.

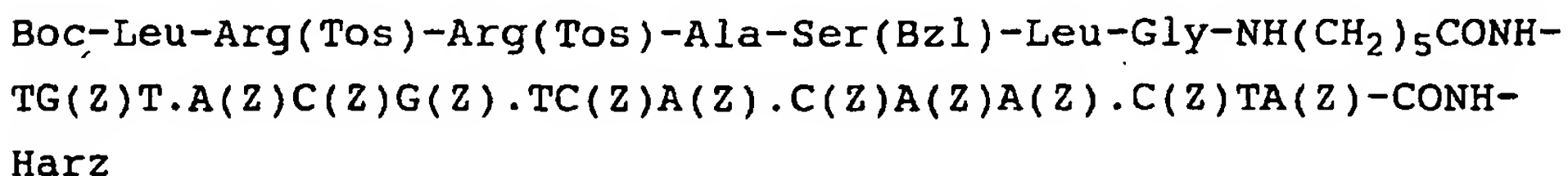
Beispiel 1

Herstellung einer PNA-Kemptid-Chimäre

Es wurde die in WO 92/20703 beschriebene Festphasen-PNA-Synthese angewandt, um diese Sequenz aufzubauen:



Die N-terminale Boc-Gruppe wurde durch Behandeln mit TFA entfernt und als Ausgangspunkt für eine standardmäßige Boc-Typ-Festphasen-Peptidsynthese der Kemptid-Struktur über den Linker 6-Aminohexansäure verwendet, um diese Chimäre zu ergeben:



Die Schutzgruppen wurden entfernt und das Produkt mit Hilfe des Low-High-TFMSA-Verfahrens vom Harz abgespalten. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HLPC (Umkehrphase-C₁₈, Elution mit einem Gradienten aus A: 0,1% TFA in Wasser (MilliQTM) und B: 0,1% TFA, 10% Wasser, 90% Acetonitril) gereinigt. Das gereinigte chimäre PNA-Kemptid wurde mittels analytischer HPLC und FAB-MS charakterisiert.

Beispiel 2

Die Kemptid-Struktur (Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly) fungiert als Substrat für covalent an eine PNA gebundene Protein-kinase A

Die PNA-Kemptid-Chimäre der Formel

H-Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly-TGTACGTCACAACTA-NH₂ wurde mit ³²P in einer Reaktionsmischung markiert, enthaltend:

PNA-Kemptid, 10 µM	5 µl
10 × Proteinkinase A-Puffer	5 µl
γ- ³² P-ATP (> 5000 Ci/mmol; 50 µCi/µl)	10 µl
Proteinkinase A (Boehringer, 5 mE/µl)	0,2 µl
H ₂ O	30 µl

Die Reaktion wurde 30 min lang bei 30°C und dann 10 min bei 65°C inkubiert, ehe 30 s lang bei 15 000 g zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorff-Röhrchen überführt. Es wurde Wasser auf 1 ml zugesetzt, und das markierte PNA-Kemptid wurde mittels Anionenaustauschchromatographie unter Verwendung einer DEAE-SephadexTM A-50-Anionenaustauschersäule vom nichteingebauten γ-³²P-ATP abgetrennt.

Die spezifische Aktivität des PNA-Kemptids wurde zu 1·10⁸ min⁻¹/µg PNA-Kemptid berechnet.

Beispiel 3

Die Hybridisierungseigenschaften der PNA werden in einer PNA-Kemptid-Chimäre beibehalten

Die Fähigkeit eines unmarkierten/³²P-markierten PNA62-Kemptids, an sein komplementäres unmarkiertes/³²P-markiertes Oligonucleotid in Lösung zu hybridisieren, wurde durch Gelwanderung in einem 20% nichtdenaturierenden Polyacrylamid-

Gel analysiert. Die Hybridisierungsstringenz wurde durch Zugabe von Formamid kontrolliert, das die T_m eines PNA62/DNA-Duplex bei etwa $\frac{1}{2}^{\circ}\text{C}/1\%$ Formamid herabdrückt. Die Hybridisierungen wurden durchgeführt in einem 20 μl -Reaktionsvolumen, enthaltend 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, sowie PNA, DNA und Formamid wie in der Figur-Legende angegeben. Die Hybridisierungsmischungen wurden 15 min lang bei 37°C inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wurden der Reaktionsmischung 4 μl Beschickungspuffer (50% Glycerin, 5 \times TBE-Puffer und 0,25% (Gew./Vol.) Bromphenolblau) zugesetzt, wonach die Proben auf ein 20% nichtdenaturierendes Polyacrylamid-Gel/1 \times TBE aufgebracht und bei 400 V 1 Stunde lang elektrophoretisiert wurden. Schließlich wurde das Gel autoradiographiert. Figur 1 zeigt die Ergebnisse der Hybridisierungsanalysen. Bahn 1: Markiertes Oligonucleotid allein (Wanderungskontrolle). Bahnen 2-4: Kontrolle PNA62 (PNA62 ohne Kemptid-Zugabe), inkubiert mit markiertem, komplementärem Oligonucleotid in Gegenwart von 0% (2), 30% (3) und 60% (4) Formamid. Bahnen 5-7: Unmarkiertes PNA62-Kemptid, inkubiert mit markiertem, komplementärem Oligonucleotid in Gegenwart von 0% (5), 30% (6) und 60% (7) Formamid. Bahnen 8-10: ^{32}P -markiertes PNA62-Kemptid, inkubiert mit unmarkiertem, komplementärem Oligonucleotid in Gegenwart von 0% (5), 30% (6) und 60% (7) Formamid. Schlußfolgernd zeigen diese Ergebnisse folgendes:

1. Durch Anbringen der Kemptid-Verlängerung an die PNA62 wird deren Fähigkeiten, mit einem komplementären Oligonucleotid zu hybridisieren, nicht wesentlich verändert.
2. Unmarkiertes und ^{32}P -markiertes PNA62-Kemptid zeigen ähnliche Hybridisierungseigenschaften.
3. Eine die Kemptid-Struktur tragende PNA ist ein Substrat für die Phosphorylierung durch Proteinkinase A.

Beispiel 4

³²P-Markiertes PNA62-Kemptid kann als Sonde zum Nachweis komplementärer DNA-Fragmente verwendet werden, die an eine Filtermembran gebunden sind

Das markierte PNA62-Kemptid wurde als Sonde zum Nachweis komplementärer Sequenzen in einem auf einer Membran immobilisierten DNA-Fragment verwendet. (Southern-Hybridisierung). DNA-Fragmente, die eine zum PNA62-Kemptid komplementäre Sequenz enthielten, und DNA-Fragmente, die eine Sequenz mit einer einzigen Fehlpaarung bezüglich des PNA62-Kemptids enthielten, wurden durch PCR-Amplifikation der passenden Plasmide erzeugt. Die DNA-Fragmente wurden durch Gelelektrophorese in einem 1% TAE-Agarose-Gel getrennt und mit Hilfe standardmäßiger Alkali-Blotting-Verfahren auf eine Hybond™ N+-Membran überführt. Das Filter wurde in einem Drehofen bei 50°C in 5 ml Hybridisierungslösung (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA) vorhybridisiert, die 4 ng unmarkiertes PNA-T10-Kemptid als Blockierungsmittel gegen unspezifische Bindung der Sonde an das Filter enthielt. Nach 1 Stunde Vorhybridisierung wurden der Vorhybridisierungslösung 5 µl ³²P-markiertes PNA62-Kemptid zugesetzt, und es wurde 16 Stunden lang bei 50°C weiterinkubiert. Das Filter wurde zweimal in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA 30 min lang bei 50°C gewaschen, luftgetrocknet und 10 Stunden lang autoradiographiert. Wie in Figur 1 gezeigt, hybridisiert die PNA62-Kemptid-Sonde wirkungsvoll an die vollkomplementären DNA-Fragmente auf dem Filter (Bahn 4). Weiterhin hybridisiert sie in einem gewissem Ausmaß an das DNA-Fragment, das die C→T-Punktmutation trägt (Bahn 2). Dies ist auch zu erwarten, da der fehlgepaarte PNA62-G/T-DNA-Duplex in Lösung eine T_m von 61°C aufweist, was oberhalb des Stringenzniveaus liegt, das der Hybridisierung auferlegt ist. Im Gegensatz zur G→T-Mutation haben die C→G- und C→A-Mutationen große Auswirkung auf die Stabilität des resultierenden PNA/DNA-Duplex in Lösung (PNA62-G/A-DNA:

$T_m = 51^\circ\text{C}$ und PNA62-G/G-DNA: $T_m = 53^\circ\text{C}$). Übereinstimmend mit diesen T_m -Daten, hybridisiert die PNA-Kemtid-Sonde nicht an die entsprechenden DNA-Fragmente auf dem Filter (Bahn 1 bzw. 3). In der Schlußfolgerung zeigen die Ergebnisse, daß ein markiertes PNA-Kemtid als Sonde bei einem Filterhybridisierungsassay verwendet werden kann, und daß derartige Sonden wirksam zwischen den vollkomplementären und Einzelbasen-fehlgepaarten Ziel-Nucleinsäuren unterscheiden können. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit anderen Membranen (Gene ScreenTM+Immobilon STM) und anderen Blockierungsreagenzien (1% Casein und 1% TritonTM X-100) erhalten.

Beispiel 5

Funktionsanalyse des Peptid-Segments der Chimäre

Die Chimäre (20 pmol) und die Kontroll-PNA (Ado₃-PNA) (20 pmol) wurden getrennt in einem Reaktionsvolumen (50 µl) inkubiert, enthaltend ³²P-γ-ATP¹ (Amersham) (100 pmol, >5000 Ci/mmol), 50 mM MES (pH 6,9), 10 mM MgCl₂, 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mg/ml BSA und 5 mE PKA1 (Boehringer Mannheim). Nach 30 min bei 30°C wurden die PNAs durch Ionenaustauschchromatographie unter Verwendung von Diethylaminoethyl(DEAE)-Sephadex A-50¹ (Sigma) von nichteingebautem γ-ATP getrennt, und die gereinigten PNAs wurden gegen die Kontroll-PNA ausgezählt. Die die chimäre enthaltende Probe hatte eine spezifische Aktivität von $2,4 \cdot 10^6 \text{ min}^{-1}/\text{pmol PNA}$. Bei Verwendung von ³²P-γ-ATP mit einer spezifischen Aktivität von 5000 Ci/mmol wäre die berechnete maximal mögliche spezifische Aktivität der Chimäre $6 \cdot 10^6 \text{ min}^{-1}/\text{pmol}$.

Die enzymatische Phosphorylierung der Chimäre wurde in einem Zeitverlaufsexperiment untersucht. Es wurde 1 mE PKA verwendet, um 1 nmol der Chimäre zu phosphorylieren. Während der Reaktion wurden Proben zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen und mittels HPLC analysiert. Innerhalb von 60 s waren ca. 20% der Chimäre phosphoryliert (Fig. 5),

09.05.98

- 16 -

und mehr als 50% waren nach 120 s phosphoryliert. Die Reaktion war innerhalb 300 s beendet. Die Identität des phosphorylierten Produkts wurde durch Massenspektroskopie bestätigt (ESI; berechnet/gefunden: 5371,1/ 5370,9).

09.05.99

- 17 -

EP-Anmeldung Nr.: 95 903 781.3

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zum Markieren eines Nucleinsäure-Analogons, umfassend das Bereitstellen eines Nucleinsäure-Analogons mit einer Peptid-Struktur, die als Substrat für ein Enzym in einer Markierungsreaktion fungieren kann, und das Durchführen einer solchen Markierungsreaktion, umfassend das Umsetzen der Peptid-Struktur des Nucleinsäure-Analogons mit einem Ausgangsstoff für die Markierung in einer durch das Enzym vermittelten Reaktion.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Markierung eine Radiomarkierung ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Ausgangsstoff für die Markierung radiomarkiertes ATP ist.
4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei das Enzym eine Proteinkinase ist.
5. Verfahren nach irgendeinem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Peptid-Struktur die Kemptid-Struktur ist.
6. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Markierungsreaktion eine Phosphorylierung an einem Serin-Rest der Peptid-Struktur ist.
7. Verfahren nach irgendeinem der vorstehenden Ansprüche, wobei das Nucleinsäure-Analogon einen polymeren Strang umfaßt, der eine Sequenz aus Liganden enthält, die an ein Gerüst gebunden sind, das aus verknüpften Gerüsteinheiten besteht, wobei das Analogon imstande

ist, an eine Nucleinsäure komplementärer Sequenz zu hybridisieren, und des weiteren diese Peptid-Struktur umfaßt.

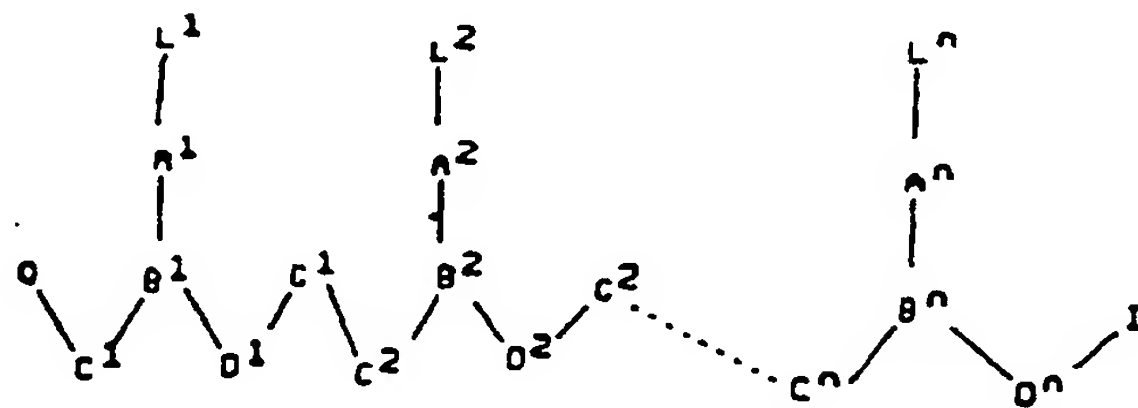
8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei das Nucleinsäureanalogon-Gerüst ein Polyamid-, Polythioamid-, Polysulfonamid- oder Polysulfonamid-Gerüst ist.
9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei die verknüpften Gerüsteinheiten Peptid-gebundene Aminosäure-Einheiten sind.
10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei die Peptid-Struktur am N-terminalen Ende oder am C-terminalen Ende vorliegt.
11. Verfahren nach irgendeinem der vorstehenden Ansprüche, wobei das Nucleinsäure-Analogon an eine Nucleinsäure komplementärer Sequenz hybridisieren kann, um ein Hybrid zu bilden, das stabiler gegen Denaturierung durch Wärme ist als ein Hybrid zwischen dem herkömmlichen, in der Sequenz dem Analogon entsprechenden Deoxyribonucleotid und der Nucleinsäure.
12. Verfahren nach irgendeinem der vorstehenden Ansprüche, wobei das Nucleinsäure-Analogon eine Peptidnucleinsäure ist, bei der das Gerüst ein Polyamid-Gerüst ist, wobei jeder Ligand direkt oder indirekt an ein Aza-Stickstoff-Atom im Gerüst gebunden ist, und die Liganden tragenden Stickstoff-Atome vorwiegend durch 4 bis 8 dazwischenliegende Atome voneinander im Gerüst getrennt sind.
13. Verfahren nach irgendeinem der vorstehenden Ansprüche, wobei das Nucleinsäure-Analogon an eine doppelsträngige Nucleinsäure hybridisieren kann, in der ein Strang eine zu dem Analogon komplementäre Sequenz aufweist, um so

09.05.98

- 19 -

den anderen Strang von diesem einen Strang zu verdrängen.

14. Verfahren nach irgendeinem der vorstehenden Ansprüche, wobei das Nucleinsäure-Analogon die allgemeine Formel I aufweist:



Formel I

worin:

n wenigstens 2 ist;

jedes der L^1-L^n unabhängig ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, Hydroxy, (C_1-C_4) -Alkanoyl, natürlich vorkommenden Nucleobasen, nicht natürlich vorkommenden Nucleobasen, aromatischen Einheiten, DNA-intercalierenden Agenzien, Nucleobase-bindenden Gruppen, heterocyclischen Einheiten, Reporter-Liganden und der Peptid-Struktur;

jedes der C^1-C^n $(CR^6R^7)_y$ ist, wobei R^6 Wasserstoff ist und R^7 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus den Seitenketten natürlich vorkommender α -Aminosäuren, oder R^6 und R^7 unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, (C_2-C_6) -Alkyl, Aryl, Aralkyl, Heteroaryl, Hydroxy, (C_1-C_6) -Alkoxy, (C_1-C_6) -Alkylthio, NR^3R^4 und SR^5 , wobei R^3 und R^4 wie nachstehend definiert sind, und R^5 Wasserstoff, (C_1-C_6) -Alkyl, hydroxy-, alkoxy- oder alkylthiosubstituiertes (C_1-C_6) -Alkyl ist, oder R^6 und R^7 zusammen genommen ein alicyclisches oder heterocyclisches System vervollständigen;

09.05.98

- 20 -

jedes der D^1-D^n $(CR^6R^7)_2$ ist, wobei R^6 und R^7 wie vorstehend definiert sind;

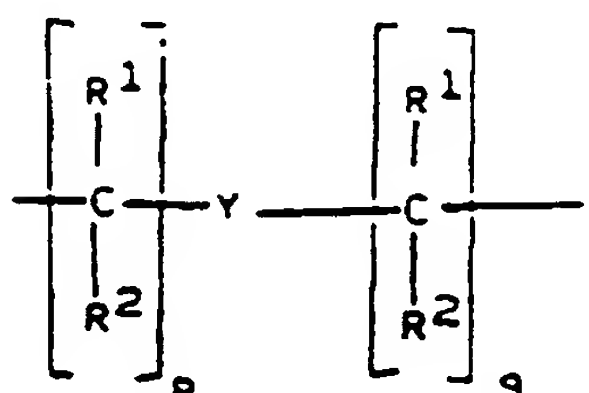
y und z jeweils null oder eine ganze Zahl von 1 bis 10 sind, wobei die Summe $y + z$ 2 bis 10 ist;

G^1-G^n jeweils $-NR^3CO-$, $-NR^3CS-$, $-NR^3SO-$ oder $-NR^3SO_2-$ in beiden Orientierungen sind, wobei R^3 wie nachstehend definiert ist;

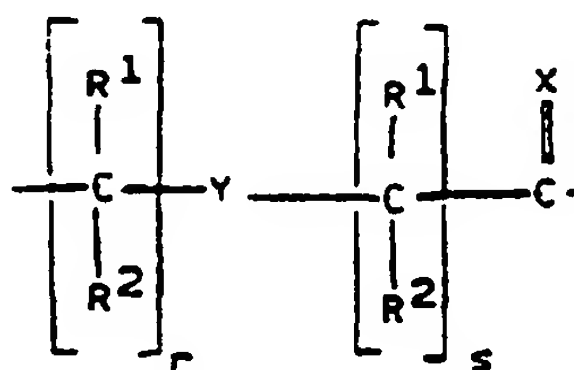
jedes der A^1-A^n und B^1-B^n so ausgewählt ist, daß:

(a) A eine Gruppe der Formel (IIa), (IIb), (IIc) oder (IIId) ist, und B N oder R^3N^+ ist; oder

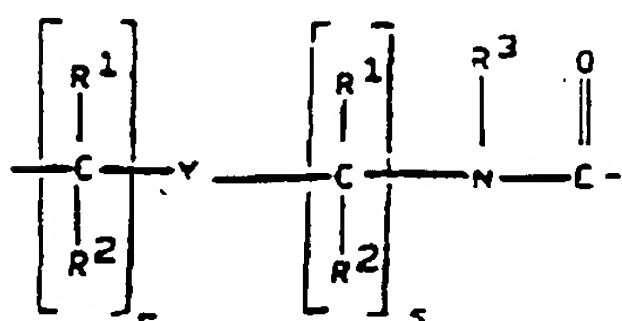
(b) A eine Gruppe der Formel (IIId) ist, und B CH ist;



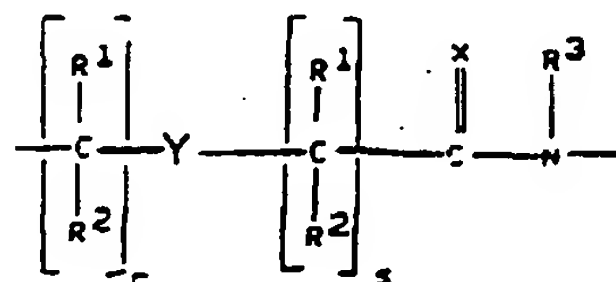
Formel IIa



Formel IIb



Formel IIc



Formel IIId

worin:

X O, S, Se, NR^3 , CH_2 oder $C(CH_3)_2$ ist;

Y eine Einfachbindung, O, S oder NR^4 ist;

p und q jeweils null oder ganze Zahlen von 1 bis 5 sind, wobei die Summe $p+q$ nicht größer als 10 ist;

r und s jeweils null oder ganze Zahlen von 1 bis 5 sind, wobei die Summe $r+s$ nicht größer als 10 ist;

R^1 und R^2 jeweils unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, (C_1-C_4) -Alkyl, das hydroxy- oder alkoxy- oder alkylthiosubstituiert sein

09.05.98

- 21 -

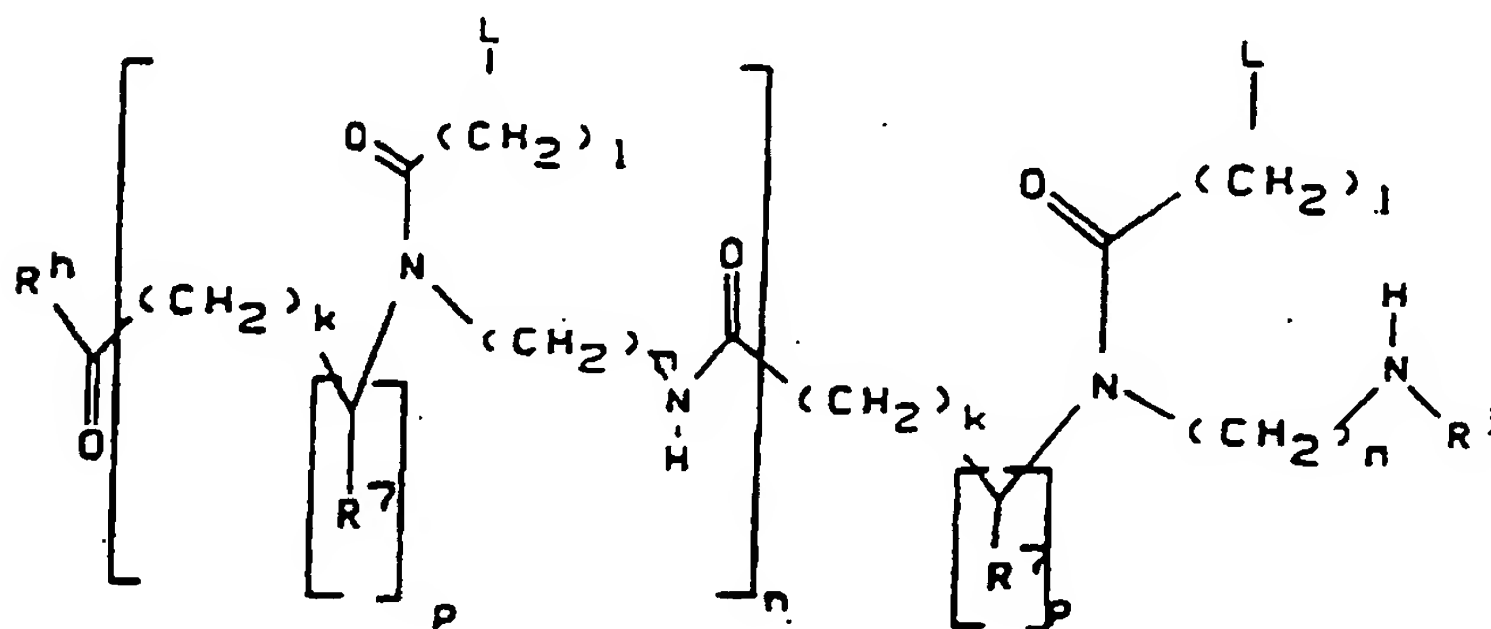
kann, Hydroxy, Alkoxy, Alkylthio, Amino und Halogen;
und

R^3 und R^4 jeweils unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, (C_1-C_4) -Alkyl, hydroxy- oder alkoxy- oder alkylthiosubstituiertem (C_1-C_4) -Alkyl, Hydroxy, Alkoxy, Alkylthio und Amino;

Q $-CO_2H$, $-CONR'R''$, $-SO_3H$ oder $-SO_2NR'R''$ oder ein aktiviertes Derivat von $-CO_2H$ oder $-SO_3H$ ist; und

I $-NR'R''$ ist, wobei R' und R'' unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, Alkyl, Schutzgruppen für Amino, Reporter-Liganden, intercalierenden Agenzien, Chelatbildnern, Peptiden, Proteinen, Kohlenhydraten, Lipiden, Steroiden, Nucleosiden, Nucleotiden, Nucleotiddiphosphaten, Nucleotidtriphosphaten, Oligonucleotiden, darunter sowohl Oligoribonucleotide als auch Oligodeoxyribonucleotide, Oligonucleosiden sowie löslichen und nichtlöslichen Polymeren, und $-R''$ eine R'' -Gruppe oder die Peptid-Struktur ist, wobei wenigstens L oder $-R''$ die Peptid-Struktur ist.

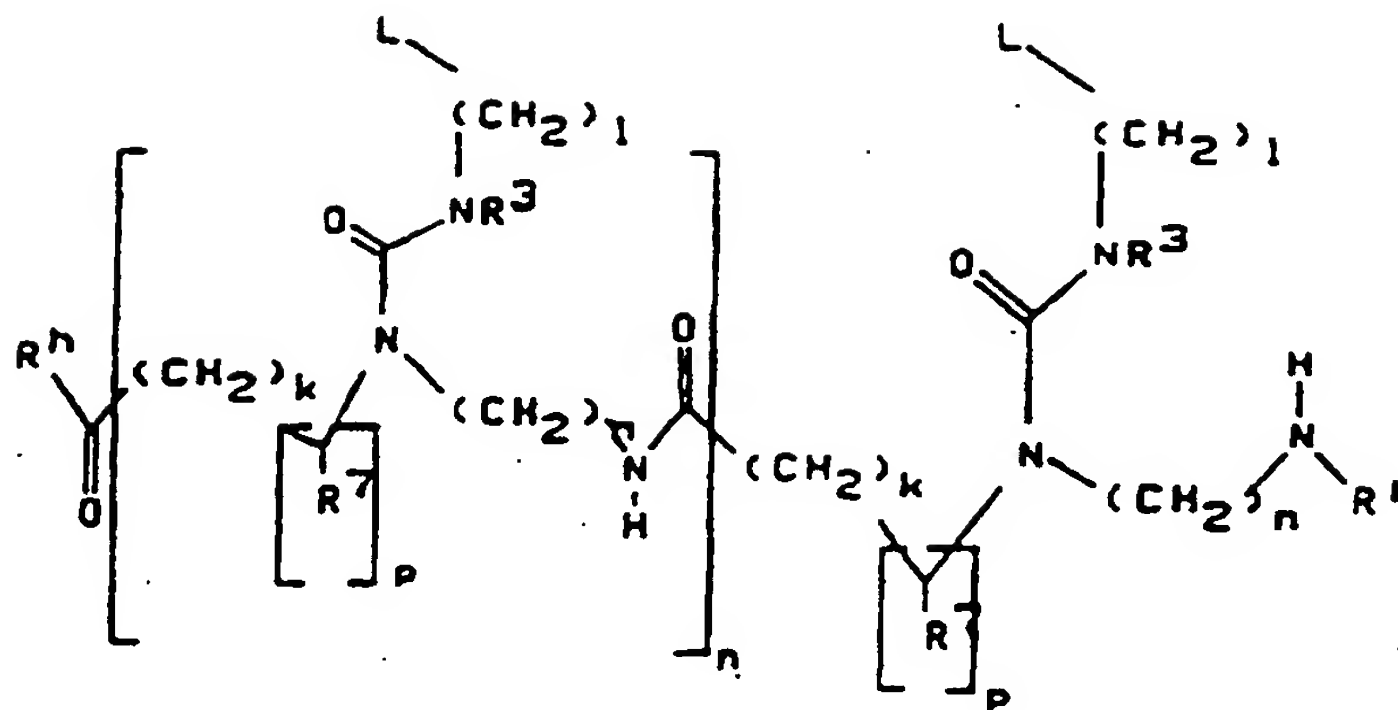
15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei das Nucleinsäure-Analogon eine Verbindung der allgemeinen Formel III, IV oder V umfaßt:



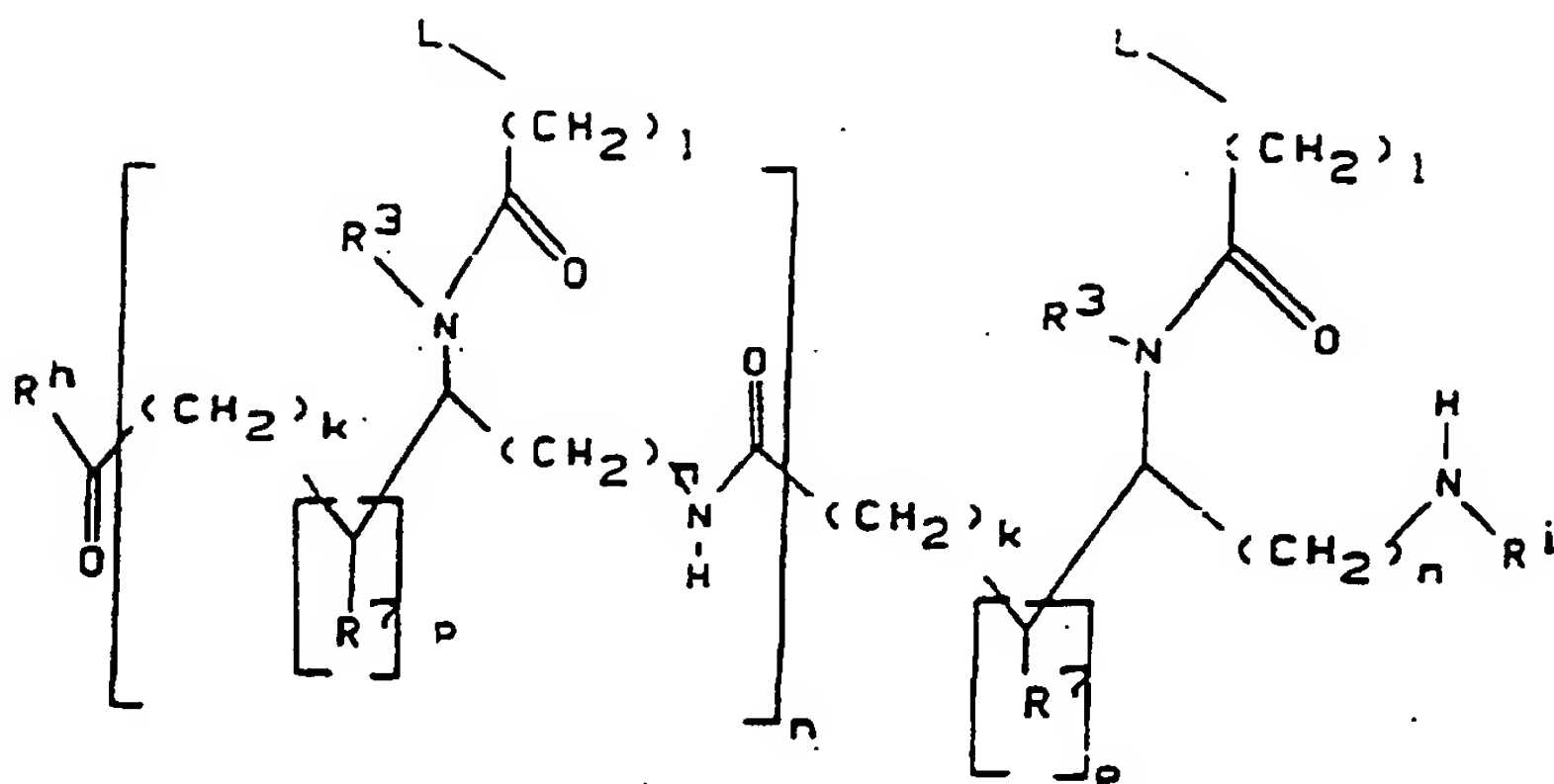
Formel III

09.05.98

- 22 -



Formel IV



Formel V

worin:

L jeweils unabhängig ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, Phenyl, heterocyclischen Einheiten, natürlich vorkommenden Nucleobasen und nicht natürlich vorkommenden Nucleobasen;

R⁷ jeweils unabhängig ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff und den Seitenketten natürlich vorkommender α-Aminosäuren;

n ein ganze Zahl größer 1 ist;

09.05.98

- 23 -

k, l und m jeweils unabhängig null oder eine ganze Zahl von 1 bis 5 sind;

p jeweils null oder 1 ist;

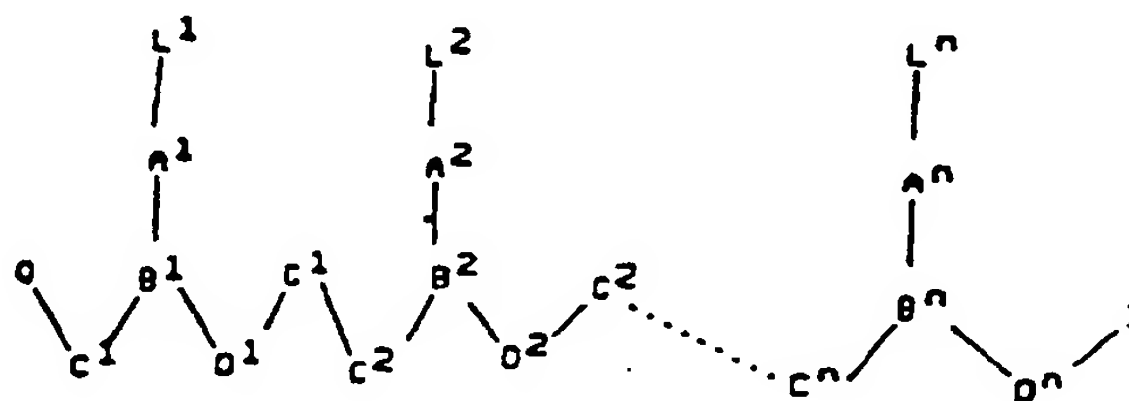
R^h OH, NH₂ oder -NHLysNH₂ ist; und

Rⁱ die Peptid-Struktur ist.

16. Nucleinsäure-Analogon, umfassend einen polymeren Strang, der eine Sequenz aus Liganden enthält, die an ein Gerüst gebunden sind, das aus verknüpften Gerüsteinheiten besteht, wobei das Analogon an eine Nucleinsäure komplementärer Sequenz hybridisieren kann, weiterhin umfassend eine Peptid-Struktur, die als Substrat für ein Enzym bei einer Markierungsreaktion fungieren kann.
17. Nucleinsäure-Analogon nach Anspruch 16, wobei die Peptid-Struktur mit radiomarkiertem ATP umgesetzt werden kann, um die Peptid-Struktur in Gegenwart einer Proteinkinase zu phosphorylieren.
18. Nucleinsäure-Analogon nach Anspruch 17, wobei die Peptid-Struktur die Kemptid-Struktur ist.
19. Nucleinsäure-Analogon nach irgendeinem der Ansprüche 16 bis 18, wobei das Gerüst ein Polyamid-, Polythioamid-, Polysulfinamid- oder Polysulfonamid-Gerüst ist.
20. Nucleinsäure-Analogon nach Anspruch 19, wobei die verknüpften Gerüsteinheiten Peptid-gebundene Aminosäure-Einheiten sind.
21. Nucleinsäure-Analogon nach Anspruch 19 oder 20, wobei die Peptid-Struktur am N-terminalen Ende oder am C-terminalen Ende vorliegt.
22. Nucleinsäure-Analogon nach irgendeinem der Ansprüche 16 bis 21, wobei das Nucleinsäure-Analogon an eine

Nucleinsäure komplementärer Sequenz hybridisieren kann, um ein Hybrid zu bilden, das stabiler gegen Denaturierung durch Wärme ist als ein Hybrid zwischen dem herkömmlichen, in der Sequenz dem Analogon entsprechenden Deoxyribonucleotid und der Nucleinsäure.

23. Nucleinsäure-Analogon nach irgendeinem der Ansprüche 16 bis 22, wobei das Nucleinsäure-Analogon eine Peptidnucleinsäure ist, bei der das Gerüst ein Polyamid-Gerüst ist, wobei jeder Ligand direkt oder indirekt an ein Aza-Stickstoff-Atom im Gerüst gebunden ist, und die Liganden tragenden Stickstoff-Atome vorwiegend durch 4 bis 8 dazwischenliegende Atome voneinander im Gerüst getrennt sind.
24. Nucleinsäure-Analogon nach irgendeinem der Ansprüche 16 bis 23, wobei das Nucleinsäure-Analogon an eine doppelsträngige Nucleinsäure hybridisieren kann, in der ein Strang eine zu dem Analogon komplementäre Sequenz aufweist, um so den anderen Strang von diesem einen Strang zu verdrängen.
25. Nucleinsäure-Analogon nach irgendeinem der Ansprüche 16 bis 24, wobei das Nucleinsäure-Analogon die allgemeine Formel I aufweist:



Formel I

worin:

n wenigstens 2 ist;

jedes der L^1-L^n unabhängig ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, Hydroxy, (C_1-C_4) -Alkanoyl, natürlich vorkommenden Nucleobasen, nicht natürlich vorkommenden Nucleobasen, aromatischen Einheiten, DNA-intercalierenden Agenzien, Nucleobase-bindenden Gruppen, heterocyclischen Einheiten, Reporter-Liganden und Peptid-Strukturen;

jedes der C^1-C^n $(CR^6R^7)_y$ ist, wobei R^6 Wasserstoff ist und R^7 ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus den Seitenketten natürlich vorkommender α -Aminosäuren, oder R^6 und R^7 unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, (C_2-C_6) -Alkyl, Aryl, Aralkyl, Heteroaryl, Hydroxy, (C_1-C_6) -Alkoxy, (C_1-C_6) -Alkylthio, NR^3R^4 und SR^5 , wobei R^3 und R^4 wie nachstehend definiert sind, und R^5 Wasserstoff, (C_1-C_6) -Alkyl ist, oder R^6 und R^7 zusammengekommen ein alicyclisches oder heterocyclisches System vervollständigen;

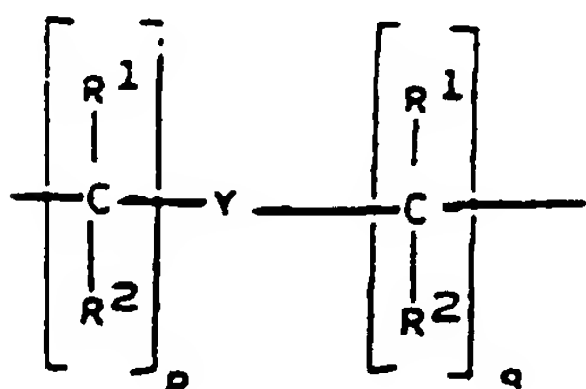
jedes der D^1-D^n $(CR^6R^7)_z$ ist, wobei R^6 und R^7 wie vorstehend definiert sind;

y und z jeweils null oder eine ganze Zahl von 1 bis 10 sind, wobei die Summe $y + z$ 2 bis 10 ist;

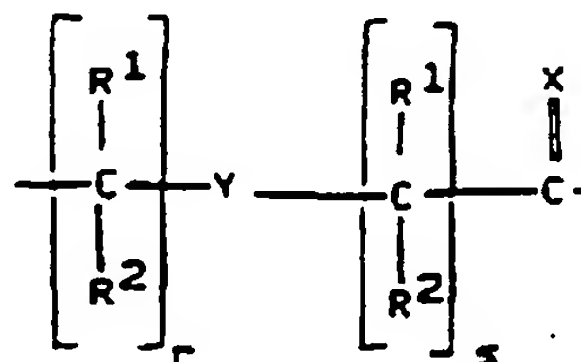
G^1-G^n jeweils $-NR^3CO-$, $-NR^3CS-$, $-NR^3SO-$ oder $-NR^3SO_2-$ in beiden Orientierungen sind, wobei R^3 wie nachstehend definiert ist;

jedes der A^1-A^n und B^1-B^n so ausgewählt sind, daß:

- (a) A eine Gruppe der Formel (IIa), (IIb), (IIc) oder (IId) ist, und B N oder R^3N^+ ist; oder
- (b) A eine Gruppe der Formel (IId) ist, und B CH ist;



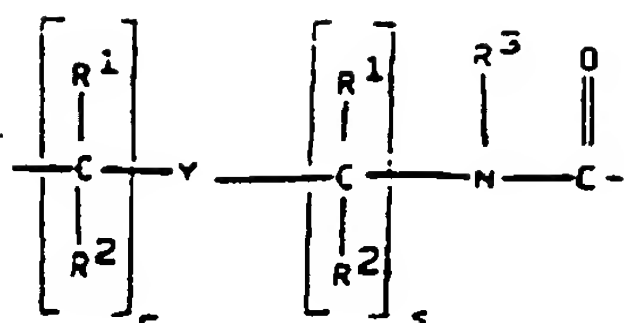
Formel IIa



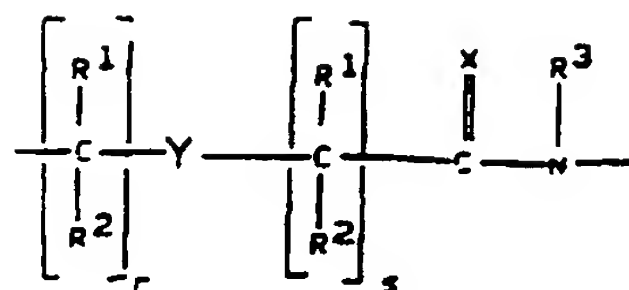
Formel IIb.

09.05.98

- 26 -



Formel IIc



Formel IIId

worin:

X O, S, Se, NR³, CH₂ oder C(CH₃)₂ ist;

Y eine Einfachbindung, O, S oder NR⁴ ist;

p und q jeweils null oder ganze Zahlen von 1 bis 5 sind, wobei die Summe p+q nicht größer als 10 ist;

r und s jeweils null oder ganze Zahlen von 1 bis 5 sind, wobei die Summe r+s nicht größer als 10 ist;

R¹ und R² jeweils unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, (C₁-C₄)-Alkyl, das hydroxy- oder alkoxy- oder alkylthiosubstituiert sein kann, Hydroxy, Alkoxy, Alkylthio, Amino und Halogen; und

R³ und R⁴ jeweils unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, (C₁-C₄)-Alkyl, hydroxy- oder alkoxy- oder alkylthiosubstituiertem (C₁-C₄)-Alkyl, Hydroxy, Alkoxy, Alkylthio und Amino;

Q -CO₂H, -CONR'R'', -SO₃H oder -SO₂NR'R'' oder ein aktiviertes Derivat von -CO₂H oder -SO₃H ist; und

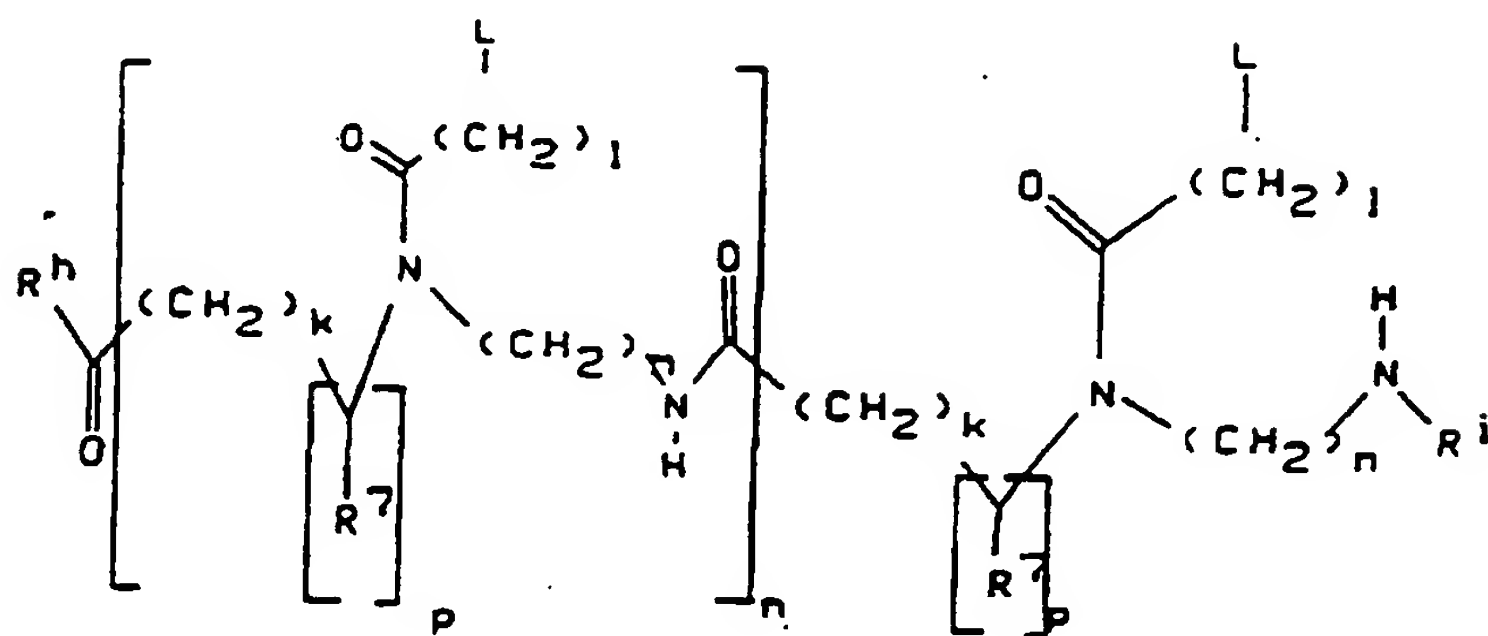
I -NR'R''' ist, wobei R' und R'' unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, Alkyl, Schutzgruppen für Amino, Reporter-Liganden, intercalierenden Agenzien, Chelatbildnern, Peptiden, Proteinen, Kohlenhydraten, Lipiden, Steroiden, Nucleosiden, Nucleotiden, Nucleotiddiphosphaten, Nucleotidtriphosphaten, Oligonucleotiden, darunter sowohl Oligoribonucleotide als auch Oligodeoxyribonucleotide, Oligonucleosiden sowie löslichen und nichtlöslichen Polymeren, und -R''' eine R''-Gruppe oder die Peptid-Struktur ist, wobei

09.05.98

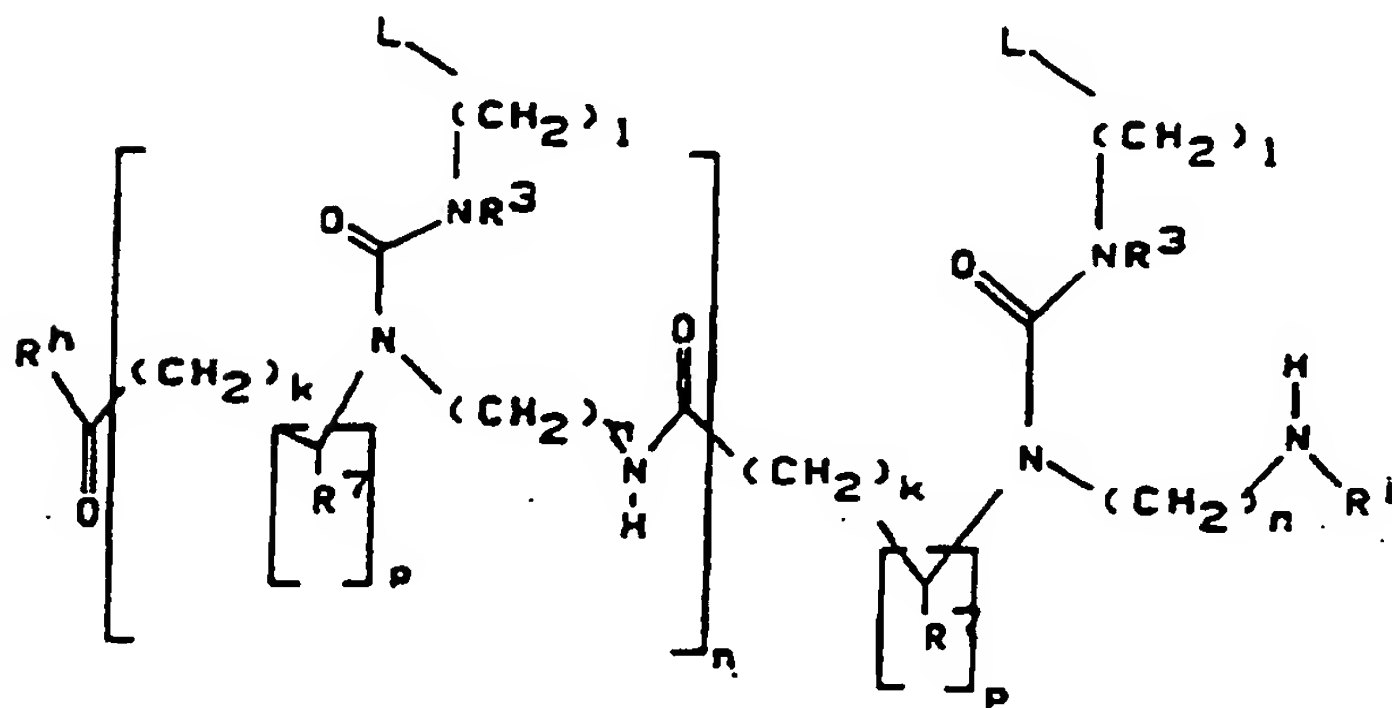
- 27 -

wenigstens ein L oder die Gruppe -R''' die Peptid-Struktur ist.

26. Nucleinsäure-Analogon nach Anspruch 25, wobei das Nucleinsäure-Analogon eine Verbindung der allgemeinen Formel III, IV oder V umfaßt:



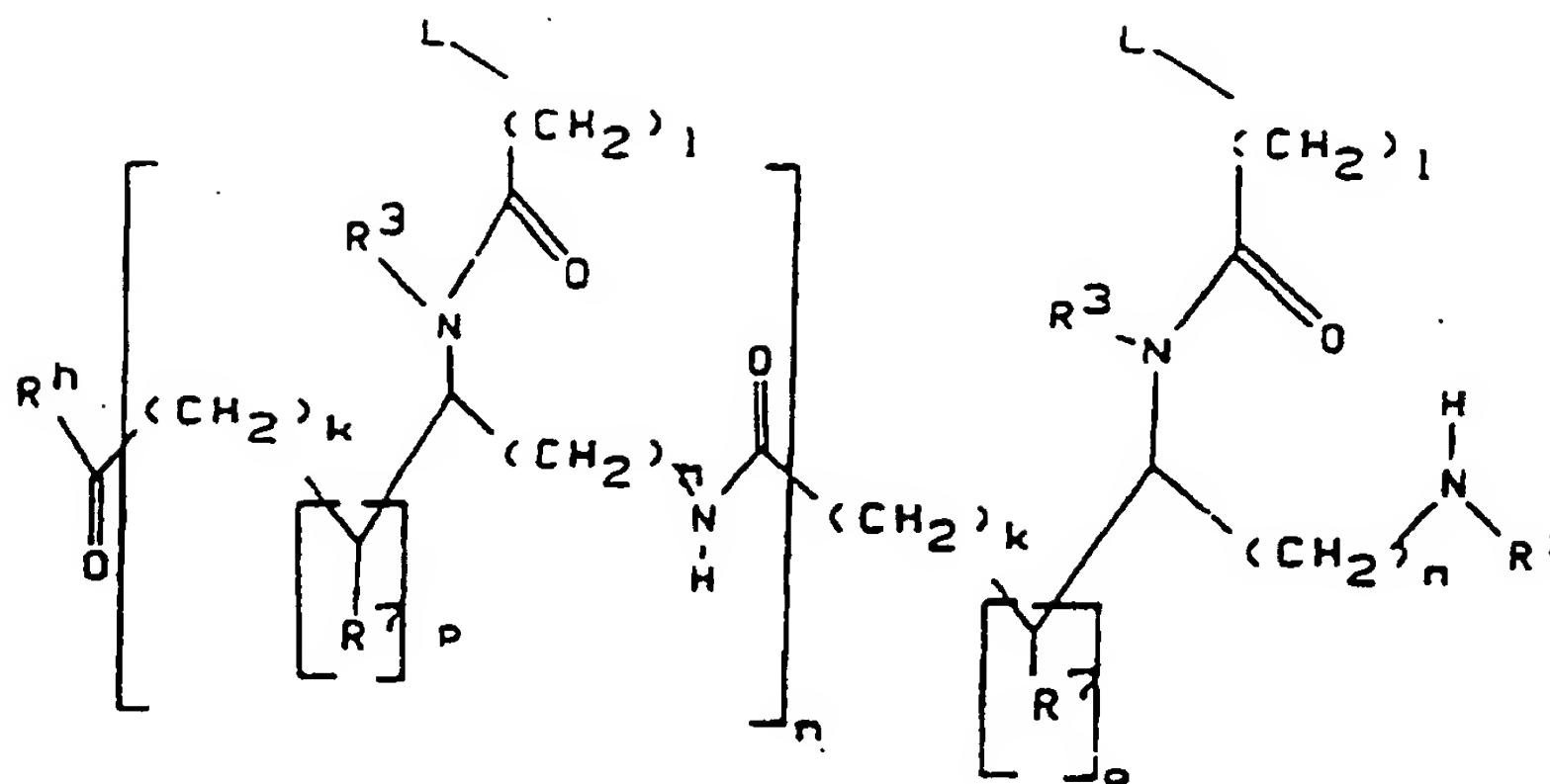
Formel III



Formel IV

09.05.98

- 28 -



Formel V

worin:

L jeweils unabhängig ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, Phenyl, heterocyclischen Einheiten, natürlich vorkommenden Nucleobasen und nicht natürlich vorkommenden Nucleobasen;

R⁷ jeweils unabhängig ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff und den Seitenketten natürlich vorkommender α-Aminosäuren;

n ein ganze Zahl größer 1 ist;

k, l und m jeweils unabhängig null oder ein ganze Zahl von 1 bis 5 sind;

p jeweils null oder 1 ist;

R^h OH, NH₂ oder -NHLysNH₂ ist; und

Rⁱ eine chelatbildende Einheit ist.

27. Analytisches Verfahren, umfassend das Hybridisieren eines radiomarkierten Nucleinsäure-Analogons, hergestellt mit Hilfe eines Verfahrens nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 15 oder nach irgendeinem der Ansprüche 16 bis 26, an eine Nucleinsäure und Nachweisen der Gegenwart des so hergestellten Hybrids mit Hilfe der Radiomarkierung.

09.05.99

- 29 -

28. Verfahren nach Anspruch 27, wobei die nachzuweisende Nucleinsäure an einen Träger gebunden ist und mit dem markierten Nucleinsäure-Analogon geprüft wird.

0733 206

09.05.98

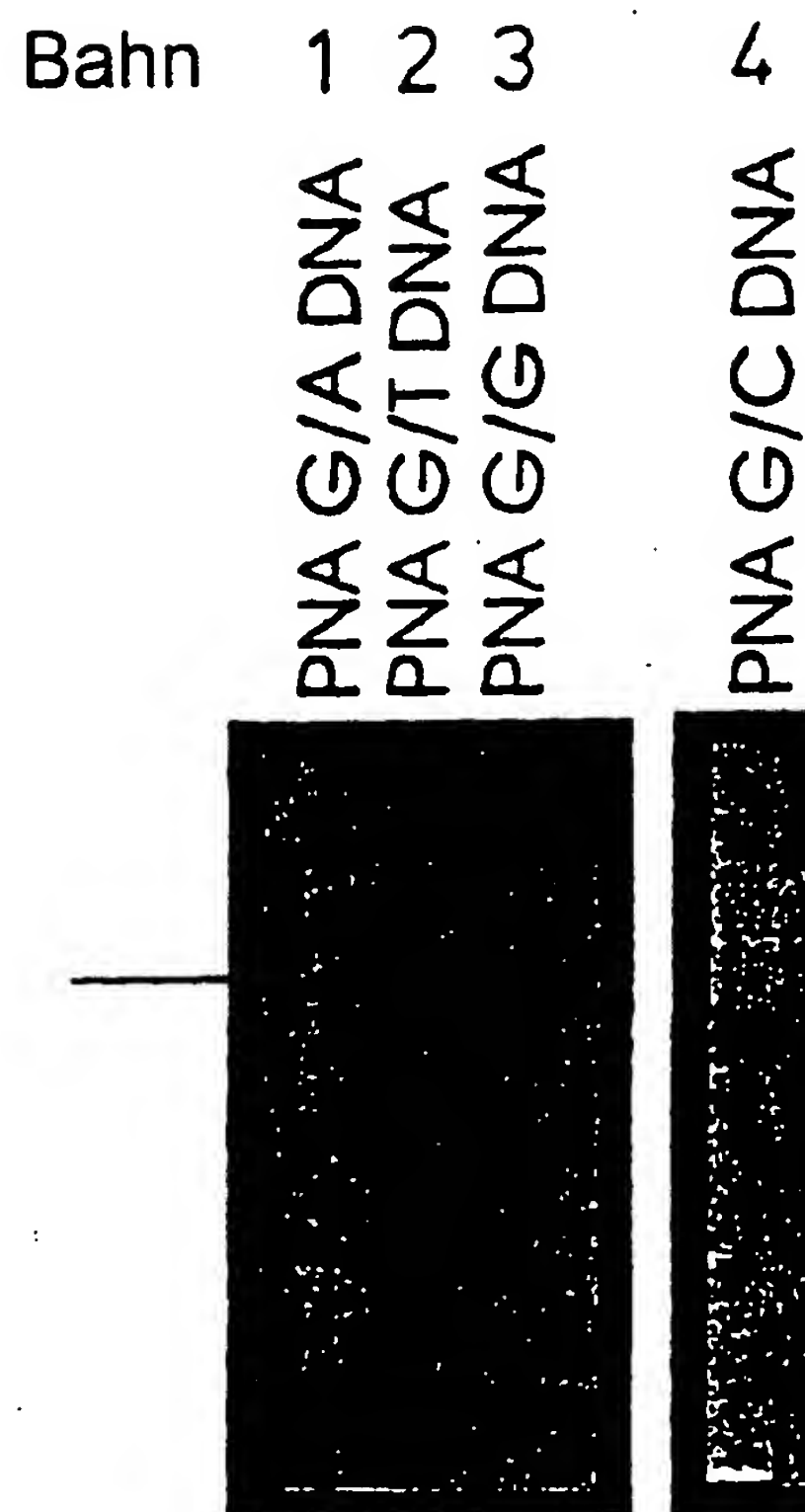
1 / 5

Bahn		Formamid in %							

09.05.98

2/ 5

FIG. 2.



A
G
T
C

DNA - - - - ACA TGC AGT GTT GAT - - - - - 5'

PNA: H-TGT ACG TCA CAA CTA-NH₂

FIG. 3

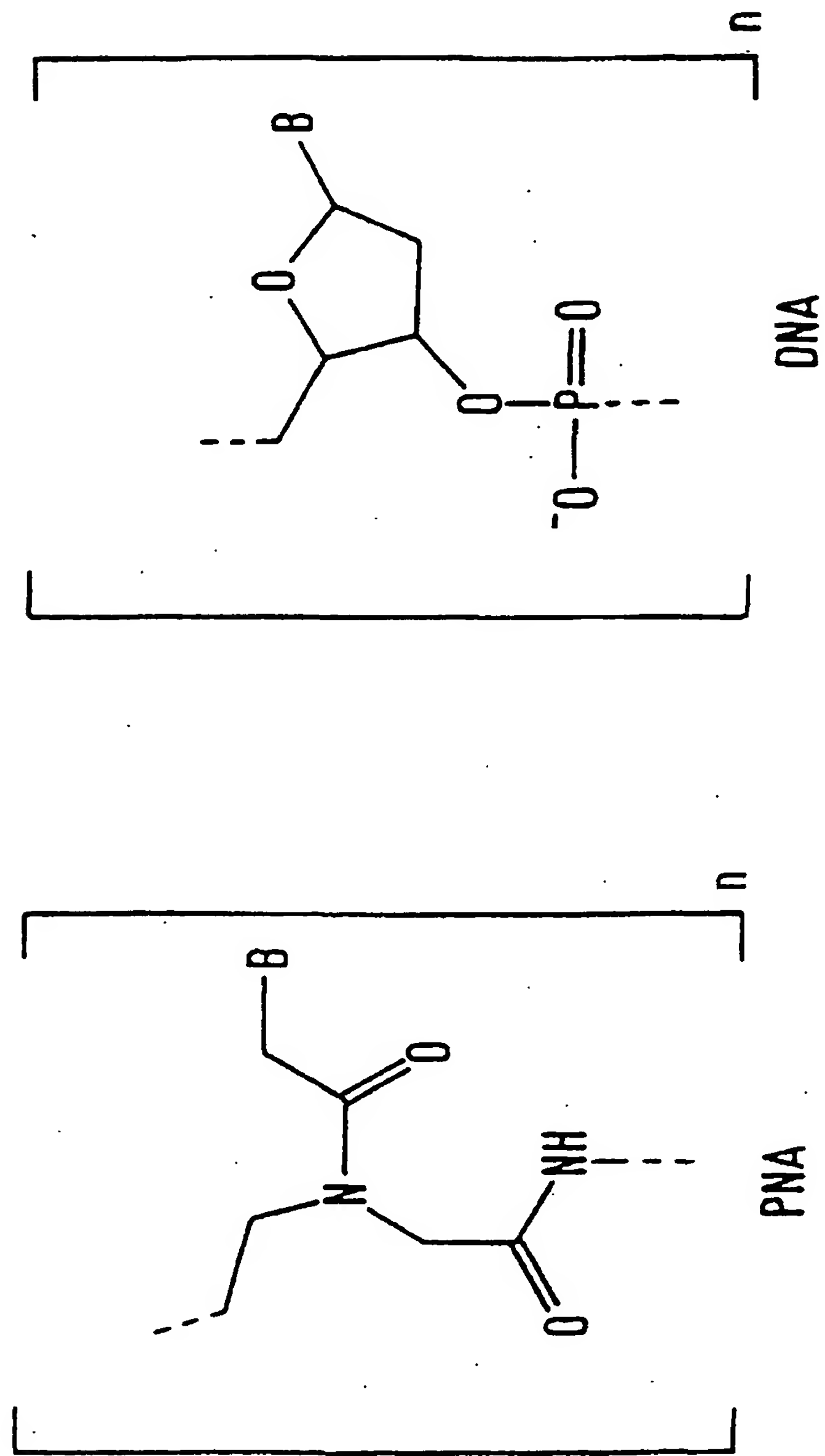


FIG. 4

Reihe	PNA/DNA-KOMPLEX	Fehlpaarung	X = ohne	X = ado ₃	Unmarkiertes X = ado ₃ -Kemptid	Markiertes X = ado ₃ -Kemptid
1	5' - CTAGAGGATCTAGTTGTGACGTACAGGATCTTTTTCATAG - 3' PNA:H ₂ N-ATCAACACTGCATGT - X	keine	67,4°C	68,8°C	70,0°C	68,8°C
2	5' - CTAGAGGATCTAGTTGTGAAAGTACAGGATCTTTTTCATAG - 3' PNA:H ₂ N-ATCAACACTGCATGT - X	G _{PNA} / A _{DNA}	51,2°C	53,1°C	55,1°C	53,9°C
3	5' - CTAGAGGATCTAGTTGTGATGTACAGGATCTTTTTCATAG - 3' PNA:H ₂ N-ATCAACACTGCATGT - X	G _{PNA} / T _{PNA}	58,9°C	60,7°C	62,3°C	61,2°C
4	5' - CTAGAGGATCTAGTTGTGAGGTACAGGATCTTTTTCATAG - 3' PNA:H ₂ N-ATCAACACTGCATGT - X	G _{PNA} / G _{DNA}	53,1°C	53,8°C	55,9°C	54,6°C

09.05.98

5 / 5

FIG. 5

